(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12)特　許　公　報（Ｂ２）　(11)特許番号
特許第5791897号
（Ｐ５７９１８９７）
(45)発行日　平成27年10月7日(2015.10.7)　(24)登録日　平成27年8月14日(2015.8.14)

(51)Int.Cl.　　ＦＩ
Ａ０１Ｈ　5/00　(2006.01)　Ａ０１Ｈ　5/00　ＺＮＡＺ
Ｃ１２Ｑ　1/68　(2006.01)　Ｃ１２Ｑ　1/68　Ｚ

請求項の数14　（全20頁）

(21)出願番号　特願2010-526837(P2010-526837)
(86)(22)出願日　平成20年9月24日(2008.9.24)
(65)公表番号　特表2010-539925(P2010-539925A)
(43)公表日　平成22年12月24日(2010.12.24)
(86)国際出願番号　PCT/NL2008/000209
(87)国際公開番号　WO2009/041810
(87)国際公開日　平成21年4月2日(2009.4.2)
審査請求日　平成23年8月23日(2011.8.23)
(31)優先権主張番号　60/974,612
(32)優先日　平成19年9月24日(2007.9.24)
(33)優先権主張国　米国(US)

前置審査

(73)特許権者　508186875
キージーン　ナムローゼ　フェンノートシャップ
オランダ王国，エヌエル－６７００　アーエー　ワーゲニンゲン，ポストブス　２１６
(74)代理人　100077838
弁理士　池田　憲保
(74)代理人　100129023
弁理士　佐々木　敬
(74)代理人　100155424
弁理士　亀谷　真太郎

最終頁に続く

(54)【発明の名称】特異的突然変異を有する植物を選択する方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
Ｍ１植物において特異的突然変異を導入及び選択する方法であって、
（ａ）複数の突然変異種子を準備する工程と、
（ｂ）Ｎ次元格子（Ｎ≧１）中に前記突然変異種子を播種する工程と、
（ｃ）前記種子から植物を成長させる工程と、
（ｄ）前記植物の一部分からＤＮＡ含有材料をサンプリングする工程と、
（ｅ）前記Ｎ次元格子のＮ次元の一次元に前記ＤＮＡ含有材料をプールする工程と、
（ｆ）プールからＤＮＡを単離する工程と、
（ｇ）前記植物の異なる部分で、前記Ｎ次元格子の任意の二次元及びさらなる次元に関して工程（ｄ）～工程（ｆ）を繰り返す工程と、
（ｈ）前記プールのそれぞれで反応産物を得るために、対象となる突然変異位置を含有するＤＮＡ（の一部分）を増幅するプライマー組（該プライマーの少なくとも１

つがプール特異的タグを含有する）で、前記プールしたＤＮＡを増幅する工程と、
（ｉ）前記反応産物をプールする工程と、
（ｊ）前記反応産物のヌクレオチド配列を決定する工程と、
（ｋ）前記格子においてそれぞれの植物を同定するために、前記プール特異的タグを使用して工程（ｈ）のプールからの前記ヌクレオチド配列をデコンボリューションする工程と、
（ｌ）Ｎ個のサンプリング部分で、所望の遺伝的突然変異を保有する植物を選択する工程と、
を含む、方法
【請求項２】
選択植物を成長させ、前記突然変異の遺伝を次の世代で確認する、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
Ｎが１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０から成る群から選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項４】

前記植物の一部分が、花、葉、枝、幹、花粉、又は地上に位置する該植物の他の部位及びそれらの組合せから選択される、請求項１に記載の方法。

【請求項５】

前記一部分が葉又は花、好ましくは本葉である、請求項４に記載の方法。

【請求項６】

前記格子の一次元に関する部分が第一花又は第一本葉であり、二次元に関する部分が第二本葉であり、三次元に関する部分が第三本葉である、請求項１に記載の方法。

【請求項７】

前記複数個の種子が少なくとも１００個の種子、より好ましくは少なくとも１０００個の種子、さらにより好ましくは少なくとも５０００個の種子である、請求項１に記載の方法。

【請求項８】

突然変異誘発剤が化学的又は物理的な突然変異誘発剤である、請求項１に記載の方法。

【請求項９】

化学的な突然変異誘発剤が、ＥＭＳ、ＤＭＳ、ＥＮＵ、ＭＮＵ、ＰＲＣ、ＤＥＢ、ＭＭＳ、クロラムブシル、メルファラン、アジ化ナトリウム、臭化エチジウム、ブロモウラシル、ブロミン又は亜硝酸から成る群から選択される、請求項１に記載の方法。

【請求項１０】

物理的な突然変異誘発剤が、ＵＶ放射線、放射性α又はγ放射線等の電離放射線である、請求項１に記載の方法。

【請求項１１】

前記タグが、少なくとも４個のヌクレオチドを含有するヌクレオチドタグであり、好ましくは前記プライマーの５’末端に位置する、請求項１に記載の方法。

【請求項１２】

シークエンシングが、ハイスループットシークエンシングに基づく、請求項１に記載の方法。

【請求項１３】

選択植物が所望の表現型の有無と相関がある、請求項１に記載の方法。

【請求項１４】

植物育種における請求項1～１２のいずれか一項に記載の前記方法の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、特異的突然変異を有する植物を選択する方法に関する。特に、本方法は、遺伝的変異の改善及び表現型の改善をもたらし得る所望のゲノム領域において突然変異を有する植物を選択する方法に関する。

【０００２】

優良遺伝資源の育種は時間とコストとがかかるプロセスである。優良株が確立されると、育種家は、株の最適な遺伝的構造を崩壊するという理由から、非適合遺伝資源による従来の交雑法及び選択法を回避する。反対に、突然変異誘導法の使用によって、特定の育種株で遺伝的変異を作り出すことへの関心が高まっている。作物の品種改良に対する突然変異の誘導の効果は、新規の誘導変異を保有する、２３１６個の正式に登録された変異型（正式に登録された突然変異型に関するＩＡＥＡデータベース）に反映されている。さらに、これらの約４分の３が、γ線による処理に由来する直接突然変異型であり、これにより突然変異による遺伝的変異型の作出の重要性が強調される。このことは全て、現在数十億ドル及び数百万ヘクタールの耕作地に値する、農業及び食糧生産に対する巨大な経済的影響へと変わる。しかしながら、突然変異の誘導の農業における可能性は十分に理解されているが、突然変異の利用には解決すべき課題が依然として存在する。

【０００３】

突然変異誘発剤は、３つのカテゴリーに分類することができる：物理的（例えばγ線）、化学的（例えばエチルメタンスルホン酸、ＥＭＳ）、及び転位因子（例えばトランスポゾン、レトロトランスポゾン、Ｔ－ＤＮＡ、レトロウイルス）。現在のところ、植物における分子レベルで誘導される遺伝作用範囲、並びにこれらの異なるカテゴリーの突然変異誘発剤及びそれらによって生じる突然変異の特異性及び相対的有効性に関して利用可能なデータは限られている。これらの作用はＤＮＡ損傷を包含し、これにより塩基対変化（一塩基変異多型（single/simple nucleotide polymorphisms）、ＳＮＰ）、小さい挿入及び欠失（インデル）及び染色体再配置が起こる。突然変異の誘導がエピジェネティックプロセス、例えばメチル化、レトロ要素の活性化、及び高次ＤＮＡ構造の摂動（perturbation）にどのように相互作用するかについて知られていることは少ない。

【０００４】

育種家は、遺伝資源の遺伝的基盤を広げるために突然変異の誘導を使用し、且つ交雑育種プログラムにおける新たな変異型又は新たな変異源として突然変異株を直接使用しているが、誘導される突然変異の正確な性質の知識は必須というわけではなかった。直感的に（Intuitively）小さい塩基対の再配置及び欠失の保存レベルは理想的なものであると考えられていた。現在、突然変異誘発法の使用は、育種における適用を超えて遺伝子発見及び逆遺伝子学にまで拡大している。これらの新規のハイスループットアプリケーションには、作物の植物ゲノム全体で高い有効性を伴って誘導される特定の群の突然変異が必要であり、結果として、誘導される突然変異の正確な性質の知識が問題となる。

【背景技術】

【０００５】

5

従来のハイスループット遺伝子発見法は、挿入による「ノックアウト」株、現在では従来型の「遺伝子合成機（gene machines）」及び「ノックアウト」ライブラリの欠損に強く依存する。挿入による突然変異は、理論上、ゲノムにおける遺伝子ごとに、トランスポゾン挿入によって不活性化される一連の株を生産するために、既知の転位因子の転位活性を誘導することを包含する。これらの株を、特定の表現型を生じる遺伝子を同定するのに使用することができ、又は反対に、特定の既知の遺伝子の不活性化に関連する表現型に関して探査することによって遺伝子機能を同定するのに使用することができる。しかしながら、挿入による突然変異型は、遺伝子機能が強く障害を受け（perturbed）、通常では完全な遺伝子ノックアウトを示すという欠点を有する。多くの場合、遺伝子を除去するのではなく、遺伝子を修飾する突然変異が望まれる。挿入による突然変異に対して、従来の突然変異誘導（特にＥＭＳ等の化学的な突然変異誘発剤）により、点突然変異、及びしたがって広範な潜在的対立遺伝子変異を誘導するという利点が与えられる。

【０００６】

比較的新しく且つ重要な逆遺伝子学アプローチは、「遺伝子変異導入法（targeting induced local lesions in genomes）」（ＴＩＬＬＩＮＧ）である。この場合、ＤＮＡ塩基対置換又はわずか数個の塩基対にわたる小さい欠失のいずれかである小さい変化の多くが一連の株で誘導される。これらの株では、表現型を、生じ得る特定の遺伝子及び既知の遺伝子の新規の対立遺伝子における変化と関連付けることによって、遺伝子機能を確認することができる。

【０００７】

これから数年で、これらのような新規の技術により、実際の植物育種における影響が増してくるであろう。突然変異プロセスを調整するために、ゲノムの所望の部分に突然変異を含有する突然変異型の選択を容易にする技術に対する必要性が存在する。さらに、突然変異を安定して導入し、すなわち育種において使用することができ、またゲノム全体に分布されている変異型を多くの突然変異型から選択する技法に対する必要性が存在する。過去には、これは解析ツール及び解析法がないという理由で不可能であった。今日では、特に並列シークエンシング法を含むハイスループットＤＮＡシークエンシング法、単一分子シークエンシングが上記のミッシングリンクの一部を提供する。例えば好例は、出願人らの技術及びキーポイントを示す同時係属出願の特許文献１に記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００８】

【特許文献１】ＷＯ２００７０３７６７８

【発明の概要】

6

【発明が解決しようとする課題】

【０００９】

しかしながら、特定の遺伝子において誘導される突然変異を選択するためのキーポイントの使用は実際には、Ｍ２として保存される特別に作製された突然変異集団、又はさらに後世代の近交集団に制限され得る。初代突然変異Ｍ１種子の少なくとも１回の自殖には、実際にはＤＮＡ解析前に体細胞キメラを取り除く必要があると考えられる。かかる突然変異集団の構築及び伝播にかかる時間及び資源の投資が相当量になるため、かかる突然変異集団を構築及び伝播することは稀であり、通常かかる突然変異集団は育種家の作物の優良遺伝資源の大部分を占めるものではない。優良育種材料の品種改良における突然変異集団の実用的使用には、これは深刻な欠点である。そのため、突然変異誘発、並びに任意の育種株、及び育種プログラムでの任意の段階又は系統における突然変異型の選択を可能にする本方法に対する必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

ここで本発明者は、上記の課題に対する解決策を見出している。この解決策は、初代突然変異種子によりキメラ植物が生じるが、セクター解析を使用して、遺伝的突然変異を特異的に選択することができるという考えに基づいている。胚性頂端幹細胞で発生するこれらの突然変異だけが、植物体全体に組み込まれ、最終的に子孫へと伝えられる。非幹細胞の突然変異は一般的に、植物の異なる部位の主要部、例えば幼植物体における第１の系列の本葉又は花を支配せず、一般的に生殖細胞系列には広がらない。この考えは、種子の突然変異の直後に、植物の任意のＭ１集団における遺伝的突然変異に関してスクリーニングする本発明に活用される。

【００１１】

本方法は、植物の異なる部位、例えば多次元マトリクスの一次座標（ｘ）において第一本葉、二次座標（ｙ）において第二本葉、及び３Ｄプーリングの場合、三次座標（ｚ）において第三本葉をプールする、特異的な多次元（二次元を超える）グリッディング戦略を使用する（図参照）。本葉の代わりに、植物の花又は他の部位（例えば花粉）を使用してもよい。キーポイント（Ｃｅｌ１等の酵素の代わりに突然変異の検出及び同定のためのハイスループットシークエンシング法を用いるＴｉｌｌｉｎｇ技術）解析後の３つの座標全てで検出された突然変異は、全ての連続葉又は他の器官に常に存在しているため、幹細胞に由来していたと考えられる。１つだけ又は２つの座標で検出され、第３の座標にはなかった突然変異は体細胞領域にある。

【００１２】

本発明は、限られた時間での突然変異集団のサンプリング及びシークエンシングを提供する。個々の突然変異型

7

植物は、任意の所望のサイズの集団から選択することができ、高い確率で特異的な遺伝的突然変異を保有して植物を繁殖させる。集団の残りは廃棄することができる。このアプローチの利点は、実際の要求に応じて、様々な作物及びそれらの優良株（複数可）で特異的に突然変異させることができることである。また、突然変異型選択には、個々の突然変異型植物を成長させる種子のみが必要であり、子孫又は世代時間は必要とされないため、世代時間が長い植物（（果）樹、ブドウ等）で受け入れられる。

【００１３】

第１の態様において、本発明は、植物において特異的突然変異を導入及び選択する方法であって、

（ａ）複数の突然変異種子を準備する工程と、

（ｂ）Ｎ次元格子（Ｎ≧１、好ましくは２、より好ましくは３）で突然変異種子を播種する工程と、

（ｃ）種子から植物（又は苗木）を成長させる工程と、

（ｄ）植物の一部分からＤＮＡ含有材料をサンプリングする工程と、

（ｅ）Ｎ次元格子のＮ次元の一次元にＤＮＡ含有材料をプールする工程と、

（ｆ）プールからＤＮＡを単離する工程と、

（ｇ）苗木の異なる部分で、Ｎ次元格子の任意の二次元及びさらなる次元に関して工程（ｄ）～工程（ｆ）を繰り返す工程と、

（ｈ）プールのそれぞれで反応産物を得るために、対象となる突然変異位置を含有するＤＮＡ（の一部）を増幅するプライマー組（該プライマーの少なくとも１つがプール特異的タグを含有する）で、プールしたＤＮＡを増幅する工程と、

（ｉ）反応産物をプールする工程と、

（ｊ）反応産物のヌクレオチド配列を決定する工程と、

（ｋ）格子においてそれぞれの植物（又は苗木）を同定するために、プール特異的タグを使用して工程（ｈ）のプールからのヌクレオチド配列をデコンボリューションする工程と、

（ｌ）所望の突然変異を保有する植物（又は苗木）を選択する工程と、

を含む、方法に関する。

【００１４】

本発明の方法は、植物における特異的突然変異の導入及び選択に関する。好ましくは、突然変異は安定な突然変異であり、すなわち従来の交雑の世代間で無制限に遺伝される。

特異的突然変異は、遺伝子又は少なくとも１つのコード領域に位置するのが好ましい。典型的には、選択される突然変異は、対象となる遺伝子のタンパク質コード領域に位置する。同様に、選択される突然変異は、タンパク質をコードしないが、任意の他の所望の又は不要の機能を示す任意の他のＤＮＡ配列（例えば遺伝子調節配列、

8

プロモータ、エンハンサ等）に位置し得る。遺伝子は、耐性遺伝子又は疾患関連遺伝子、収率又は任意の発生学的機能、物理学的機能若しくは生化学的機能について知られている特異的遺伝子等の対象となる任意の遺伝子から仮想的に選択することができる。この場合、選択された遺伝子は、その遺伝子調節配列、プロモータ、エンハンサ等を含んでいる。好ましくは、突然変異は対象となる遺伝領域に位置している。特異的突然変異の選択を、任意の事前の表現型の特徴付けをせずに、すなわち導入される突然変異が植物の表現型を変化させるか否かを事前に解析せずに行うことができる。

【００１５】

また本発明は、生得的機能（ascribed function）を有してはいないが、少なくとも幾つかのヌクレオチド配列情報が知られている、すなわち、遺伝子に特有のプローブを与えるのに少なくとも十分である、対象となる遺伝子において突然変異の同定を可能にすることにより、遺伝子機能の解析における第１の工程を提供する。これにより、本発明は、任意の種の植物で適用可能であり得るＴＩＬＬＩＮＧ及びキーポイントに類似した逆遺伝的なツールを提供する。

【００１６】

このようにして、第１の工程で、複数の突然変異種子を準備する。かかる複数の種子は、手持ちのケース（case at hand）に応じて、少なくとも１００個の種子、又は少なくとも１０００個の種子又はさらには少なくとも５０００個又は５００００個もの種子であり得る。種子は任意の植物由来であり得る。種子は、任意の既知の手段で突然変異させることができるが、化学的手段が好ましい。複数の種子は例えば、種子バッチで構成することができ、それによりそれぞれのバッチは同じ若しくは異なる突然変異誘発手段を使用して突然変異されているか、又はその後の若しくは並行した突然変異誘発（mutagenisation）を行っている。本発明での突然変異誘発手段は、化学的又は物理的な手段であり、例えばエチルメタンスルホン酸（ＥＭＳ）、ＤＭＳ、Ｎ－エチル－Ｎ－ニトロソ尿素（ＥＮＵ）、Ｎ－メチル－Ｎ－ニトロソ尿素（ＭＮＵ）、ＰＲＣ、メチルメタンスルホン酸（ＭＭＳ）、クロラムブシル、メルファラン、アジ化ナトリウム、臭化エチジウム、ブロモウラシル、ブロミン若しくは亜硝酸、塩酸プロカルバジン、シクロホスファミド、硫酸ジエチル、アクリルアミドモノマー、トリエチレンメラミン（ＴＥＭ）、ナイトロジェンマスタード、ビンクリスチン、ジメチルニトロソアミン、Ｎ－メチル－Ｎ'－ニトロ－ニトロソグアニジン（ＭＮＮＧ）、７，１２ジメチルベンズ（ザ）アントラセン（ＤＭＢＡ）、酸化エチレン、ヘキサメチルホスホルアミド（ＨＭＰＡ）、ビスルファン、ジエポキシブタン（ＤＥＢ）等の化学的な突然変異誘発剤の中から選択される。

【００１７】

9

一般的に、Ｘ線、γ線、中性子等により、ＤＮＡの破壊が引き起こされる。ＤＮＡ破壊の細胞修復機構により、再配置及び欠失を含む大きな損傷を含有するＤＮＡ領域が生じる。本発明によると、他の種類の突然変異の解析が好ましいが、より多くの塩基を包含するという点でより大規模になる傾向がある放射線誘導性の突然変異の解析も本発明に包含される。ＵＶ光誘導性の突然変異は主に単一ヌクレオチド変化である。

【００１８】

好ましい実施の形態において、突然変異生物は、少なくとも約１個の突然変異が１００００個～１０００個の遺伝子ごとに生じるように突然変異している。好ましくは、突然変異誘発工程は、１／５００、好ましくは１／１００、より好ましくは１／１０の生物の平均頻度で生物において対象となる遺伝子に（遺伝的）突然変異を導入することを含む。突然変異誘発法を、例えば突然変異誘発手段に曝す期間を延ばすことによって、これらの割合を達成するために適合させることができる。好ましくは、上記の方法のいずれかにおける突然変異は、例えば約１個～１０個の塩基対の範囲での単一塩基対突然変異又は短い挿入又は欠失の突然変異である。

【００１９】

続いて、種子をN次元格子で成長させる。格子が少なくとも１D、すなわちN≧１であり、N＝１は個別の単一の植物の解析を示唆している。より多くの次元が特異的突然変異を保有すれば、変異が遺伝性である可能性が高くなるので、この格子は、手持ちのケースに応じて所望であれば又は有用であると考えられれば、より高次の次元を有することができる。実際、シークエンシングコスト（要求される冗長性が増大するので、Nが大きくなればより高くなる）と、遺伝性に関する信頼度との間には二律背反（trade off）が存在する。その都度、最適なNを求めることができるが、典型的にはN≧３が好ましい。好ましい実施の形態では、Nは、３、４、５、６、７、８、９、１０、好ましくは３、４、５、６、より好ましくは３から成る群から選択される。種子から、苗木を植物へと成長させる。苗木（又は得られる植物の一部）を、例えば葉又は花を穿孔することによってサンプリングすることができるが、可能であれば本葉又は花全体をサンプリングするのが好ましい。植物又は苗木それぞれから、ＤＮＡ含有材料の試料を、植物の一部分から採取する。

突然変異種子を播種することにより得られたそれぞれの植物又は苗木に対して、試料を、同じ部分、例えば第一本葉又は第一花から採取する。格子におけるそれぞれの次元で、ＤＮＡ含有材料をサンプリングする。それぞれの次元で、ＤＮＡ含有材料を植物の別の部分からサンプリングする。このため、二次元では、例えば第二本葉等から材料をサンプリングする。本発明の一実施の形態では、植物の一部分はそれぞれ独立して、花、葉、枝、幹

10

又は地上に位置する植物の他の部位、及びそれらの組合せから選択される。本発明の一実施の形態では、一部分は葉、好ましくは本葉である。本発明の一実施の形態では、格子の一次元に関する部分が第一本葉であり、二次元に関する部分が第二本葉であり、三次元に関する部分が第三本葉である。

【００２０】

ＤＮＡ含有材料をプールし、それにより、それぞれの部分をプールの各次元にプールする。このため、三次元格子では、植物の第１の部分由来のＤＮＡ含有材料をプールの一次元にプールし、植物の第２の部分由来のＤＮＡ含有材料をプールの二次元にプールし、以下同様に続け、続いてＤＮＡの単離に関して従来の方法及び手段のいずれかを使用して、ＤＮＡをプールから単離する。

【００２１】

ここで、プールしたＤＮＡを、ＤＮＡの増幅に関して従来の手段、例えばＰＣＲを使用して増幅することができるが、他の技法でも同様に十分であり得る。ＰＣＲ増幅の場合、対象となる領域又は遺伝子を含有するＤＮＡ（の一部）を増幅する（又はスパンする）プライマー組を用いてプールしたＤＮＡを増幅させる。好ましくは、プライマーの少なくとも１つは、タグ、好ましくは、プールを同定するヌクレオチドタグを含有する。このように、反応産物をそれぞれのプールで得ることにより、反応産物をプールと連結させることができ、プールからプール特異的タグを使用して反応産物を増幅した。これによりここで、全てＤＮＡ断片を含有し、異なる植物を基としており、対象となる領域で多様の突然変異を含有すると思われる反応産物のプールが得られる。

【００２２】

「タグ」又は「ヌクレオチドタグ」という用語、「タギング（tagging）」という動詞は、核酸試料を第２の又はさらなる核酸試料又は増幅産物と区別させるための、タグの核酸試料への付加を表す。例えば、増幅中の配列識別子の付加、又は当該技術分野で既知の任意の他の手段によってタギングを行うことができる。かかる配列識別子は例えば、特定の核酸試料を同定するのに独自に使用され、変化するが、規定の長さの特有の塩基配列であり得る。その典型例は例えばＺＩＰ配列である。かかるタグを使用して、さらなるプロセシングの際に試料の起源を決定することができる。異なる核酸試料に由来するプロセシング産物を組み合わせる場合、異なるタグを使用して、異なる核酸試料を同定することができる。タグは識別子配列と呼ばれることもある。上述のように、かかる識別子配列は、比較される核酸試料の量に応じて様々な長さであり得る。約４塩基の長さ（4^4＝２５６の異なり得るタグ配列）は通常、限定数の試料（最大２５６個）の起源間で区別するのに十分であるが、タグ配列は、区別される試料の間で２つ以上の塩基が異なるのが好ましい。このため必要に応じて、タグ配列の長さを調

11

整することができる。タグはプライマーの５’末端に位置するのが好ましい。

【００２３】

ここで、望ましくは反応産物をプールし、シークエンシングにかけることができる。当該技術分野においてシークエンシングに関して既知の方法のいずれかを使用して、シークエンシングを行うことができる。シークエンシングしなければいけない配列の数が大量である場合は、国際公開第０３／００４６９０号、国際公開第０３／０５４１４２号、国際公開第２００４／０６９８４９号、国際公開第２００４／０７０００５号、国際公開第２００４／０７０００７号、及び国際公開第２００５／００３３７５号（全て454 Life Sciencesの名前で）において、またSeo et al.（2004）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 :5488-93によって開示される方法のような、並びにHelios, Solexa, US Genomicsの技術等のハイスループットシークエンシング法が好ましい（これらは参照により本明細書中に援用される）。記載の454 Life Sciences技術により現在では、１回で最大１億個の塩基のシークエンシングが可能であり、これは競合技術よりも１００倍迅速且つ安価である。１つの反応当たりの解読長が増大すると、及び／又は並行反応の数が増大すると、これが増大する。シークエンシング技術は大まかに５つの工程から成る：１）一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）のライブラリを作製するためのＤＮＡの断片化及び特定のアダプタのライゲーション；２）ｓｓＤＮＡのビーズへのアニーリング、油中水型マイクロリアクタにおけるビーズの乳化、及びビーズ上の個々のｓｓＤＮＡ分子を増幅するためのエマルションＰＣＲの実行；３）それらの表面上に増幅ｓｓＤＮＡ分子を含有するビーズの選択／濃縮；４）ＰｉｃｏＴｉｔｅｒＰｌａｔｅ（登録商標）におけるＤＮＡ保有ビーズの堆積；並びに５）ピロリン酸光シグナルの発生による複数のウェルにおける同時シークエンシング。

【００２４】

シークエンシング後、シークエンシング工程から直接得られる断片の配列を、好ましくはコンピュータ内でトリミングして、任意のビーズアニーリング配列、シークエンシングプライマー、又はアダプタ関連配列情報を取り除いてもよい。コンピュータ内でこれを行うことにより、タグによって与えられる情報を、ＤＮＡプールにおいて発見された遺伝的突然変異（遺伝子）とアドレスとを後に結び付けるように、別々のデータベース領域に保存することができる。

【００２５】

典型的には、任意の付加されたアダプタ／プライマー及び／又は識別子配列に関してトリミングされている配列データで、すなわち核酸試料に由来する断片からの配列データのみを使用して、アラインメント又はクラスタリングを行う。

12

【００２６】

比較目的での配列のアラインメント法は当該技術分野で既知である。様々なプログラム及びアラインメントアルゴリズムが、Smith and Waterman（1981）Adv. Appl. Math. 2:482；Needleman and Wunsch（1970）J. Mol. Biol. 48:443；Pearson and Lipman（1988）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444；Higgins and Sharp（1988）Gene 73:237-244；Higgins and Sharp（1989）CABIOS 5:151-153；Corpet et al.（1988）Nucl. Acids Res. 16:10881-90；Huang et al.（1992）Computer Appl. in the Biosci. 8:155-65；並びにPearson et al.（1994）Meth. Mol. Biol. 24:307-31（これらは参照により本明細書中に援用される）に記載されている。Altschul et al.（1994）Nature Genet. 6:119-29（参照により本明細書中に援用される）には、配列アラインメント法及び相同性の計算の詳細な考察が示されている。

【００２７】

ＮＣＢＩのＢａｓｉｃ Ｌｏｃａｌ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ Ｓｅａｒｃｈ Ｔｏｏｌ（ＢＬＡＳＴ）（Altschul et al., 1990）は、配列解析プログラムであるｂｌａｓｔｐ、ｂｌａｓｔｎ、ｂｌａｓｔｘ、ｔｂｌａｓｔｎ及びｔｂｌａｓｔｘと関連させて使用するのに、全米バイオテクノロジー情報センター（ＮＣＢＩ、Bethesda, Md.）を含む幾つかのソースから、及びインターネット上で利用可能である。ＢＬＡＳＴは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>でアクセス可能である。このプログラムを使用してどのように配列同一性を決定するかという記載は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html>で利用可能である。データベースは、ＥＳＴ配列、対象となる種のゲノム配列、及び／又はＧｅｎＢａｎｋの非冗長配列データベース又は同様の配列データベースを含むのが好ましい。

【００２８】

ハイスループットシークエンシング法を、Shendure et al. Science, Vol 309, Issue 5741, 1728-1732に記載されるように使用することができる。その例は、微小電気泳動シークエンシング、ハイブリダイゼーションシークエンシング／シークエンシングバイハイブリダイゼーション（ＳＢＨ）、増幅分子上の環状アレイシークエンシング、単一分子上の環状アレイシークエンシング、非環状単一分子リアルタイム法、例えばポリメラーゼシークエンシング、エキソヌクレアーゼシークエンシング、ナノ細孔シークエンシングである。

【００２９】

最良の結果のためには、断片又は増幅産物を十分な冗長性でシークエンシングすることが興味深い。冗長性とは、シークエンシングエラーと生来のゲノム配列との区別を可能にするものである。或る特定の実施の形態では、シークエンシングの冗長性は、好ましくは少なくとも４、より好ましくは少なくとも５であり、６を超える、好

13

ましくは８を超える、又はさらに１０を超える冗長性が好都合であると考えられるが、本発明の概念には必須のものではない。

【００３０】

シークエンシング後に続く工程では、苗木がそれぞれ格子において、プール特異的タグを使用することによる工程（ｈ）の配列のデコンボリューションによって同定される。それぞれの苗木又は植物で、格子の次元数に合わせて、同じ突然変異とプール関連タグとの組合せを回収することができるか否かを求める。言い換えれば、格子が三次元を含有する場合、同じ突然変異が特定の苗木又は植物と結び付くプールアドレスを同定する３つのタグと共に３回回収されれば、さらなるプロセシングが検討されるような形で誘導突然変異が導入されている可能性がある。図１における方法の概略図も参照されたい。これらの選択された苗木又は植物を成長させてもよく、突然変異の遺伝を次の世代で確認することができる。苗木又は植物を成長させ、育種に使用することもできる。ここで、選択された苗木又は植物を、対象となる表現型の有無に関して解析することができ、言い換えれば選択された突然変異を、異なる表現型を与えることができるか、又は突然変異が試験した表現型とは無関係であるかに関して評価することができる。遺伝的に存在するが、対象となる領域には突然変異を保有しない、すなわち解析する植物のあらゆる部分に回収される突然変異種子の元となる集団の一部を廃棄することができる。

【図面の簡単な説明】

【００３１】

【図１】格子上でのサンプリング及び分布の方法の概略図である。

【図２】ＡＮ１及びＲＴに関する突然変異型におけるキメリズムパターンを示す図である。丸は花冠に相当する。黒色は突然変異型組織を示し、白色は野生型組織を示す。丸の垂直方向の並び（vertical stack）はそれぞれ花序を示し、最下部の円は初めに形成された花であり、最上部の円は５番目の花である。部分的に黒い円は、温室で観察されるような実際の色素パターンでキメラ花を示している。

【図３】ＲＴ遺伝子に関する個々のＦ１突然変異型植物のサンガーシークエンシングによって検出された、ＥＭＳ誘導性の点突然変異の位置を示す図である。突然変異は赤色で示し、基準となるＷＴヌクレオチドは青緑色で示す。

【図４】ハイスループット突然変異解析に使用されるＲＴ遺伝子の断片を示す図である。

矢印は、ゲノムＤＮＡのプールからのこの断片の増幅に使用されるプライマーを示す（表１も参照されたい）。黒色で印を付けたヌクレオチドは、表現型で選択されたＥＭＳ突然変異型ｍ２及びｍ１７における突然変異の位置であり、塩基の変化を括弧内に示す。

14

【図５】三座標格子におけるプールした植物のハイスループット配列解析の結果を示す図である。Ｘ軸は座標軸を示す（Ｘ、Ｙ、Ｚはそれぞれ、黒色、灰色及びストライプである）。Ｙ軸はＲＴ断片の特異的点突然変異がそれぞれの座標に由来する配列解読において生じる回数を示す。２つの突然変異型ｍ２及びｍ１７で、３つの（Ｘ、Ｙ、Ｚ）座標の特有の組合せはバックグラウンドよりも強調して見ることができる。これらの組合せは単一の植物に相当し、格子におけるこれらの突然変異型の所定の位置に適合している。

【発明を実施するための形態】

【００３２】

以下、実施例に基づいて説明する。

【実施例】

【００３３】

キメリズムの突然変異誘発及び解析

記載の方法を実証するため、及びその成功に寄与する組織サンプリングパラメータを推測するために、本発明者らは、図２に示されるように、ペチュニア・ハイブリダ（Petunia hybrida：ペチュニア）において遺伝的スキームを使用した。赤紫色の花をつけるＦ１ハイブリッドのペチュニアを近交株Ｗ５（ａｃｔ１、ＡＮ１：：ｄＴｐｈ１、ｒｔ：：ｄＴｐｈ３）とＭ１（ａｃｔ１、ＡＮ１、ＲＴ）との交雑から産生し、２つの花色遺伝子で劣性対立遺伝子（ＡＮ１、ｒｔ）を保有する二重ヘテロ遺伝子型が生じた。これらの２つの遺伝子の１つ（ＡＮ１）は、花冠におけるアントシアニン色素の産生に必要とされる転写因子である（Spelt et al. 2000）。ＡＮ１でのヌル突然変異型により、白色花が生じる。第２の遺伝子（ＲＴ）はＵＤＰラムノース：アントシアニン－３－グルコシドラムノシルトランスフェラーゼである。本明細書中で使用される遺伝的バックグラウンドでは、ＲＴのヌル突然変異型が、シアニジン－３－グルコシドの集積の結果として赤色の花をつける（Kroon et al. 1994, Brugliera et al. 1994）。両方の劣性色のマーカーは、それぞれｄＴｐｈ１及びｄＴｐｈ３挿入を保有するトランスポゾン挿入対立遺伝子であることに留意されたい（Spelt et al. 2000, Kroon et al. 1994）。親株とＦ１ハイブリッドとの両方がｄＴｐｈ１の活性化因子を喪失しており（ａｃｔ１、Stuurman and Kuhlemeier 2005 The Plant Journal Volume 41 Issue 6, Pages 945-955）、ｄＴｐｈ３が転位欠損であるため（Kroon et al. 1994）、これらのエレメントの転位は起こらない。Ｆ１ハイブリッド種子のエチルメタンスルホン酸（ＥＭＳ）による突然変異誘発処理の際、得られる植物の幾つかは、ＡＮ１又はＲＴの野生型対立遺伝子において新規の突然変異を保有する。かかる植物はキメラであり、赤紫色の花の背景色に対する白色又は赤色の花冠又は花冠部位の割合によって視覚的に同定され得る。

【００３４】

15

３６００個のＦ１植物集団をＥＭＳ処理種子から成長させ、花色に関するセクタリングパターンを、初代の花序のみで視覚的に記録した。二次花序が腋生分裂組織から成長し、それらのがい葉にクローン的に由来するのに対し（Furner and Pumfrey 1992）、初代の花序は胚性茎頂分裂組織にクローン的に由来すると規定される。結果を概略的に図２に示す。総数１９個の突然変異型がＡＮ１及びＲＴで共に観察された。図に示すように、キメリズムは、大きい領域でのみ起こり（花のほぼ半分）、花序の加齢に従って徐々にキメリズムが消失するという所定のパターンに従っていた。５つの花をつけた後、キメリズムは消失し、植物は、安定して突然変異型の色を獲得するか、又は完全な野生型を発生した。

安定した突然変異型及び野生型の数はほぼ等しく、これは胚性頂端分裂組織における２つの不安定な始原細胞（幹細胞）を反映していると思われる。

【００３５】

種子で突然変異させた、ペチュニアの大きいＦ１集団は、初代花序で５番目の花の後に非キメラとして扱うことができることが、これらのデータから結論付けられる。実際、このことは突然変異をＤＮＡスクリーニング法のいずれかによって特異的遺伝子で探査する場合、この段階で又はこの段階の後で、花序組織を節（nodes）からサンプリングすればよいということを示唆している。これらの試料が特定の点突然変異を示す場合、植物は全ての組織、及び続いて発生する枝において突然変異を安定して保有する。図２から分かるように、サンプリングを、より早い段階、例えば２番目の花の後で行ってもよく、安定した突然変異型として発生する個体を同定する機会としては極めて良好である。

【００３６】

サンガーシークエンシングによる突然変異の分子的確認

花色に関する表現型でのスクリーニングがＡＮ１又はＲＴの遺伝子における突然変異によるものであったことを実証するために、完全に突然変異型のＦ１個体の５番目の花序節由来の苞葉を、ゲノムＤＮＡの単離及び遺伝子配列の解析のために採取した。ＲＴ遺伝子はイントロンを含有せず、約１．５ｋｂのコード配列全体を単一のプライマー対でＰＣＲ増幅させる。便宜上、ＲＴのみを詳細に解析し、結果は、類似性によりＡＮ１に適用すると推測される（assumed）。ＲＴに関するプライマーを、Ｗ５親ではなくＭ１親由来の対立遺伝子のみを増幅させるように設計した。この特異性は、２つの親間での天然ＲＴ配列多型に基づいており、設計されるオリゴヌクレオチドプライマーを差別化することができた（図示せず）。これにより、Ｗ５株に存在していたトランスポゾン挿入対立遺伝子ではなく、Ｍ１親由来の排他的なＥＭＳ誘導性の対立遺伝子のシークエンシングが可能となった。

【００３７】

16

７個の赤色の花をつけるＦ１突然変異型全てにおいて、ＲＴコード領域全体の従来のサンガーシークエンシングを、細菌プラスミドベクターにクローン化したＰＣＲ産物で行った。突然変異型Ｆ１植物それぞれに関して、２０個の独立した組み換えプラスミドにおけるＲＴ産物をシークエンシグした。この解析により、１つを除いて全てのＦ１植物で点突然変異が明らかにされた。これらの突然変異の種類及び位置を図３に示す。

【００３８】

しかしながら、全てのＦ１植物において、２０個の組み換えプラスミド全てが突然変異を示したわけではなく、１つの植物当たりの突然変異による挿入頻度は３～６に及ぶ。これは、サンプリングした組織が突然変異型の対立遺伝子に関して遺伝型がホモ型ではなかったことを示している。植物の表現型がホモ型であった場合、Ｆ１突然変異型は、植物体の組織原基盤である、３つのクローン細胞層Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３の１つに突然変異を保有する周縁キメラであった。Ｌ１層は花冠の表皮を構成し、アントシアニン色素沈着は表皮に限定されることが知られている（参考文献）。このため、解析したＲＴ突然変異型は、完全に突然変異型のＬ１層を含有していたが、Ｌ２及びＬ３層は野生型であった。

【００３９】

表現型によるＦ１突然変異型の選択により周縁キメラが同定され、点突然変異が予測遺伝子で見出されると結論付けられた。このため、遺伝型による突然変異スクリーニングを３６００個のＦ１植物全てで行い、個々の植物１つの初代花序の４番目の花節を超えた少なくとも２つの連続した花節で特定の突然変異が見出される場合、その植物は、３つの細胞層Ｌ１、Ｌ２又はＬ３の（少なくとも）１つにおいて安定した周縁キメラである。

【００４０】

ハイスループットシークエンシングにより突然変異型が正しく同定される

本発明がハイスループットモードでの特異的遺伝子における突然変異のＦ１選択を可能にすることをさらに実証するために、454 Life Sciencesのシークエンシング技術（Margulies et al. 2005）を使用して、個々の植物の大きな集合においてＲＴアンプリコン配列を解析した。総数３６００個のＥＭＳ突然変異Ｆ１ハイブリッドから採取した１４４０個の植物の部分集合を温室内で格子状に配置した。格子は、３５個の座標（ｘ１～ｘ９、ｙ１～ｙ１０、ｚ１～ｚ１６）を有する三座標軸（ｘ、ｙ、ｚ＝行、ブロック、列）から成っており、個々の植物の総数は、９×１０×１６＝１４４０個であった。格子におけるそれぞれの植物は、３つの軸それぞれにおける１つの座標の特有の（ｘ、ｙ、ｚ）組合せに対応する。この群の１４４０個の植物では、２つの周縁ＲＴ突然変異型（図３のｍ２及びｍ１７）が含まれ、特有の既知の位置に位置していた（ｍ２＝Ｘ１０、Ｙ２、Ｚ８；ｍ１

７＝Ｘ１、Ｙ１、Ｚ２）。これらの突然変異型はＲＴ遺伝子の１９９塩基対セグメント内にＥＭＳ誘導性の点突然変異を含有するものとして選択され、これはＧＳ－ＦＬＸ Ｇｅｎｏｍｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｒ（Roche, 454 Life Sciences）の平均解読長内であった。

【００４１】

格子における１４４０個の植物全ての花序における４番目、５番目及び６番目の花節における苞葉から組織サンプリングを行った。４番目の花節はブロックを表し、５番目の花節は行を表し、６番目の花節は列を表していた。それぞれの植物及びそれぞれの試料で等量の組織を採取することに注意した。組織試料をそれらの座標に従ってプールし、９＋１０＋１６＝３５個の組織プールを得た。これらのプールした組織をホモジナイズした後、ゲノムＤＮＡを抽出した。これにより、１４４０個の植物全てが３５個のＤＮＡ試料で表された。したがってプーリングのレベルは、１つの行当たり１４４０／９＝１６０個の植物、１つのブロック当たり１４４０／１０＝１４４個の植物、及び１つの列当たり１４４０／１６＝９０個の植物に対応している。

【００４２】

これらの３５個のＤＮＡ試料のそれぞれの中で、ＲＴ遺伝子の特異的な１９９ｂｐセグメント（図４）を、ＲＴ特異的プライマーを使用するＰＣＲによって増幅した。これらのプライマーは、特異的な５塩基のヌクレオチド配列（以下タグと呼ぶ）によって５’末端で伸長し、格子における３５個の座標それぞれがタグの異なる配列によって規定された。

プライマーは、Ｍ１親に由来するＲＴ対立遺伝子のみを増幅するように設計し、このＲＴ対立遺伝子は表現型によるスクリーニングによって同定されたＥＭＳ誘導性の点突然変異を保有しているとされる。得られる３５個のＰＣＲ産物集合は、ＤＮＡ試料を構成していた個々の植物由来の産物の混合物である。３５個のＰＣＲ産物全てをプールし、ＧＳ－ＦＬＸ Ｇｅｎｏｍｅ Ａｎａｌｙｚｅｒ（Roche）でシークエンシングして、総数５４９６４６個の個々の配列解読を得た。個々の解読は、ＲＴ特異的な増幅プライマーの配列の直前に座標特異的な５’タグを保有するので、格子の３５個の単一座標の１つを割り当てることができる。特定の配列変異型（すなわちＥＭＳ誘導性の点突然変異）により、３つの座標軸（例えばｘ１、ｙ１、ｚ１）の特有の組合せが生じる場合、この変異型を個々の植物１つに対する実際の（true）点突然変異として割り当てることができる。ペチュニアのこの特定の実施例において、４番目の花序節を超えた組織からＤＮＡ試料を採取していれば、１つだけ（又は稀に２つの）座標で生じる他の突然変異は全てシークエンシングエラーであるといえる。

【００４３】

格子の所定の位置に含まれていた既知の配列を有する３

つのＲＴ突然変異型に関して（ｍ１、ｍ２及びｍ１７、図３）、これらの特定のヌクレオチド突然変異を、突然変異型塩基を含んでいた１２個の塩基配列ストリングの完全な適合を求めることによって配列のデータセットにおいて探査した。これらの探査は、順（５’→３’）方向及び逆相補（３’→５’）方向の両方で行った。続いて、突然変異型塩基を含有していた配列解読の中で、５塩基タグを同定し計測した。図５から分かるように、これらの植物の位置は、（ｘ、ｙ、ｚ）座標の特有の組合せによって容易に同定することができ、ここで突然変異が、任意の他の座標よりも非常に高い頻度で発生した。これらのデータは、安定した突然変異型植物を、表現型による選択をせずに、総数１４４０個の植物から正しく同定することができることを示している。植物のこの数は増やすことができる。

【００４４】

材料及び方法

ＥＭＳ突然変異誘発

（Ｗ５×Ｍ１）Ｆ１ハイブリッドのペチュニアの乾燥種子（およそ５０００個の種子）３６０ｍｇを、１０ｍｌの試験管中の０．５％（ｖ／ｖ）エチルメタンスルホン酸（ＥＭＳ、Sigma-Aldrich）５ｍｌに浸漬させ、十分に混合した。種子を室温で１４時間ＥＭＳ溶液中に置いた。それから種子を、水１０ｍｌで１０回十分に洗浄し、土の上に播種した。苗木が２つの第一本葉をつけた後、苗木を４０ポット（８×５）トレーに移し、２００８年１月に温室内で三次元格子状に配置した。苗木を２４℃で明期１６時間で成長させた。

【００４５】

ＲＴ突然変異型のキメラ植物のサンガーシークエンシング

個々の植物の５番目の花の下にある苞葉組織を採取した。全ゲノムＤＮＡをQiagenのＤＮｅａｓｙ植物ミニキットを使用して単離した。完全なＲＴコード配列を、それぞれＲＴ遺伝子の５’及び３’非コードリーダー及びトレーラーに位置しているプライマー０８Ａ２８１及び０８Ａ２８２を使用してＰＣＲ増幅した（表１を参照されたい）。反応液は、総量５０μｌで、２５ｐｍｏｌの各プライマー、０．２ｍＭのｄＮＴＰ、１×ＰＣＲ緩衝液、５０ｎｇのゲノムＤＮＡ、１ユニットのＡｍｐｌｉＴａｑ Ｇｏｌｄ ＤＮＡポリメラーゼ（Applied Biosystems）から成っていた。熱サイクルは、最初の９５℃で１０分間の後に、９５℃で３０秒、５５℃で６０秒、７２℃で６０秒を３５サイクル、その後最終伸長を７２℃で６分行った。産物をアガロースゲル電気泳動での単一バンドとして確認し、細菌プラスミドベクターでクローン化した。標準的なサンガー連鎖ターミネータ法を利用して、２０個の無作為にピックアップしたコロニー由来の組み換えプラスミドを自動キャピラリシーケンサを使用してシークエンシングした。同じ塩基変化が２０個の

19

配列集合で３回以上起こった場合、ＥＭＳ誘導性の突然変異（ＳＮＰ）を表していた。

【００４６】

ＧＳ　ＦＬＸシークエンシング法によるハイスループット突然変異検出

植物を温室内の厳密に保持された位置に保った。４番目、５番目又は６番目の花の下にある苞葉を個々の植物それぞれで採取し、このシステムにおける３５個の座標に従ってプールした。苞葉組織の３５個のプール全てを液体窒素中でホモジナイズし、－８０℃で保存した。QiagenのＤＮｅａｓｙ植物ミニキットを使用する全ゲノムＤＮＡの単離のために組織粉末試料を採取した。ＲＴ遺伝子の単一セグメントのＰＣＲ増幅を、表１に列挙されるプライマーを使用して行った。３５個の座標それぞれで、それぞれの座標がＰＣＲ産物の両方の末端上で単一タグによって特定されるように、同じ５塩基タグを保有する１対のフォワードプライマー及びリバースプライマーを使用した。反応は、総量２５μｌで、３０ｎｇのゲノムＤＮＡ、０．５mMのｄＮＴＰ、２５ｐｍｏｌの各プライマー、１ユニットのＡｍｐｌｉＴａｑＤＮＡポリメラーゼ（Applied Biosystems）を用いて実施した。熱サイクルは、最初の９５℃で５分間、その後９４℃で３０秒、６５℃で３０秒、７２℃で３０秒を３５サイクル行った。ＰＣＲ産物を、ＱＩＡｑｕｉｃｋ　ＰＣＲ精製キット（Qiagen）を使用して精製し、アガロースゲル電気泳動の後単一バンドとして確認した。

【００４７】

２５℃で１５分間、総量４０μｌで1mMのｄＮＴＰの存在下において０．５ユニットのＫｌｅｎｏｗ酵素と共にインキュベーションすることにより、３５個のＰＣＲ産物全てを平滑末端化させた（blunt）。最終濃度が１０mMになるまでＥＤＴＡを添加し、その後７２℃で２０分間加熱することによって反応を停止させた。それから試料をＱＩＡｑｕｉｃｋ　ＰＣＲ精製キット（Qiagen）を使用して精製し、１０mMのＴｒｉｓ（ｐＨ＝８．５）中に溶出した。続いて３５個の平滑末端化した産物全てを、３７℃で３０分間、総量４０μｌで０．２５mMのＡＴＰの存在下で２０ユニットのＴ４ポリヌクレオチドキナーゼと共にインキュベーションことにより５’リン酸化させ、その後ＱＩＡｑｕｉｃｋ　ＰＣＲ精製キット（Qiagen）を使用して精製し、１０mMのＴｒｉｓ（ｐＨ＝８．５）中に溶出した。

【００４８】

３Ｄプール由来の平滑末端化したリン酸化増幅産物を、Margulies et al.（2005）によって記載されたように、454 Life Sciencesの技術を使用してＧＳ－ＦＬＸシーケンサ（Roche）でハイスループットシークエンシングを行った。３５個のＰＣＲ産物全てを、２５℃で４時間、総量１２μｌで、１×リガーゼ緩衝液（Roche Life Sciences、ＧＳ　ＤＮＡライブラリ調製キット）、０．

20

１μｌのアダプタ（Roche Life Sciences、ＧＳ　ＤＮＡライブラリ調製キット）及び1Ｗｅｉｓｓユニットの Ｔ４　ＤＮＡリガーゼにおいてＰＣＲ産物５０ｎｇをインキュベーションすることにより、454 Life Sciencesのアダプタ配列に別々にライゲーションした。続いて、ライゲーションした産物を、標準的なＰＣＲ増幅プライマー（Roche Life Sciences、ＧＳ　ＤＮＡライブラリ調製キット）を使用してＰＣＲ増幅した。熱サイクルは、総量２５μｌで、４μｌのライゲーションミックス、０．５mMのｄＮＴＰ、２５ｐｍｏｌの各プライマー、１ユニットのＡｍｐｌｉＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ（Applied Biosystems）を用いて行った。熱サイクルは、最初の７２℃で６０秒、９５℃で５分、その後９４℃で３０秒、５５℃で３０秒、７２℃で３０秒を２５サイクル行った。増幅産物をアガロースゲル電気泳動で解析し、１つの最終試料にプールした。それからこの試料を、製造業者の取扱説明書に従ってＧＳ－ＦＬＸ装置（Roche Life Sciences）を使用してプロセシング及びシークエンシングした。

【００４９】

配列出力の中で突然変異を検出するために、生の配列（５４９６４６個の解読）を、突然変異型ｍ２及びｍ１７に存在するＳＮＰ突然変異の存在に関して探査した。ストリング「ｍ２フォワード」：ＧＧＴＴＴＡＧＴＴＣＡＧ［配列番号１］及び「ｍ２リバース」：ＣＴＧＡＡＣＴＡＡＡＣＣ［配列番号２］、並びに「ｍ１７フォワード」：ＧＧＴＧＡＣＣＡＧＡＴＴ［配列番号３］及び「ｍ１７リバース」：ＡＡＴＣＴＧＧＴＧＡＣＣ［配列番号４］に対する１００％適合を同定することによって探査を行った。これらのストリングに適合した解読を、座標同定のためにこれらの５’タグの配列に従って分類し、計測した。それから図５のように計測値を表示した。

【００５０】

参考資料

Spelt C, Quattrocchio F, MoI JN, Koes R. (2000) Anthocyanini of petunia encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes. Plant Cell 12(9): 1619-32.

Brugliera F, Holton TA, Stevenson TW, Farcy E, Lu CY, Cornish EC. (1994) Isolation and characterization of a cDNA clone corresponding to the Rt locus of Petuniahybrida. Plant J. 5(1):81-92.

Kroon J, Souer E, de Graaff A, Xue Y, MoI J, Koes R. (1994) Cloning and structural analysis of the anthocyanin pigmentation locus Rt of Petunia hybrida: characterization of insertion sequences in two mutant alleles. Plant J. 5(1):69-80.

Furner I. J., Pumfrey J. E. (1992) Cell fate in the shoot apical meristem of Arabidopsis thaliana. D

evelopment 115, 755-764
Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, et al. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature 437:376-80

【００５１】

【表１－１】

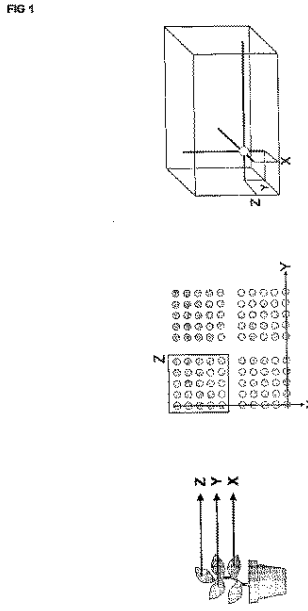
プライマーリストサンガーシークエンシング				
08A281	CCAATAATGAACGCTTGCTCGCAG	[配列番号５]		
08A282	GCATCAGAATGCTGGGAACATCG	[配列番号６]		
プライマーリストキーポイント				
	順			逆
08Z848	ACACGTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号７]	08Z888	ACACGTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号４７]１
08Z849	ACATCTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号８]	08Z889	ACATCTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号４８]２
08Z850	ACGACTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号９]	08Z890	ACGACTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号４９]３
08Z851	ACGCTTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号１０]	08Z891	ACGCTTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号５０]４
08Z852	ACTGCTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号１１]	08Z892	ACTGCTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号５１]５
08Z853	AGAGCTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号１２]	08Z893	AGAGCTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号５２]６
08Z854	AGATGTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号１３]	08Z894	AGATGTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号５３]７
08Z855	AGCATTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号１４]	08Z895	AGCATTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号５４]８
08Z856	AGCTCTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号１５]	08Z896	AGCTCTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号５５]９
08Z857	AGTAGTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号１６]	08Z897	AGTAGTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号５６]１０
08Z858	AGTCTTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号１７]	08Z898	AGTCTTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号５７]１１
08Z859	ATACTTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号１８]	08Z899	ATACTTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号５８]１２
08Z860	ATCAGTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号１９]	08Z900	ATCAGTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号５９]１３
08Z861	ATCGTTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号２０]	08Z901	ATCGTTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号６０]１４
08Z862	ATGATTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号２１]	08Z902	ATGATTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号６１]１５
08Z863	ATGTGTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号２２]	08Z903	ATGTGTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号６２]１６
08Z864	CACGTTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号２３]	08Z904	CACGTTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号６３]Ａ
08Z865	CACTGTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号２４]	08Z905	CACTGTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号６４]Ｂ
08Z866	CAGATTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号２５]	08Z906	CAGATTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号６５]Ｃ
08Z867	CAGCGTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号２６]	08Z907	CAGCGTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号６６]Ｄ
08Z868	CATAGTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号２７]	08Z908	CATAGTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号６７]Ｅ
08Z869	CATGCTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号２８]	08Z909	CATGCTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号６８]Ｆ
08Z870	CGACTTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号２９]	08Z910	CGACTTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号６９]Ｇ
08Z871	CGATCTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号３０]	08Z911	CGATCTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号７０]Ｈ
08Z872	CGCAGTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号３１]	08Z912	CGCAGTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号７１]Ｊ

【００５２】

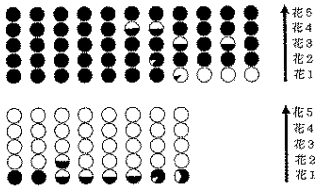
【表１－２】

08Z873	CGCGCTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号３２]	08Z913	CGCGCTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号７２]ⅠⅠ
08Z874	CGTATTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号３３]	08Z914	CGTATTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号７３]ⅡⅠ
08Z875	CGTCGTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号３４]	08Z915	CGTCGTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号７４]ⅢⅠ
08Z876	CTAGTTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号３５]	08Z916	CTAGTTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号７５]ⅣⅠ
08Z877	CTATGTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号３６]	08Z917	CTATGTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号７６]ⅤⅠ
08Z878	CTCATTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号３７]	08Z918	CTCATTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号７７]ⅥⅠ
08Z879	CTGAGTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号３８]	08Z919	CTGAGTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号７８]ⅦⅠ
08Z880	CTGCTTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号３９]	08Z920	CTGCTTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号７９]ⅧⅠ
08Z887	TATCGTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号４０]	08Z927	TATCGTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号８０]Ⅸ
08Z885	TAGTCTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号４１]	08Z925	TAGTCTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号８１]Ⅹ
08Z886	TATACTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号４２]	08Z926	TATACTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号８２]
08Z881	TACATTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号４３]	08Z921	TACATTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号８３]ⅨⅠ
08Z882	TACGCTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号４４]	08Z922	TACGCTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号８４]
08Z883	TAGAGTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号４５]	08Z923	TAGAGTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号８５]
08Z884	TAGCTTCCACCCCAGCTTCCATATCACC	[配列番号４６]	08Z924	TAGCTTCATTCAGGTTGGGTGCAACAGC [配列番号８６]

【図１】



【図２】

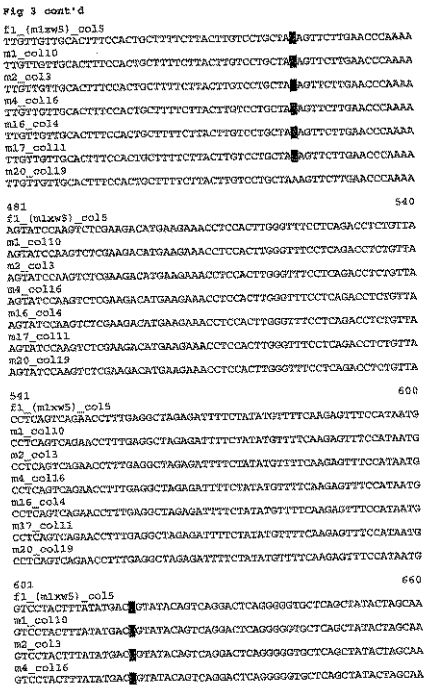


ＲＴ突然変異型の対立遺伝子のサンガー法による再シークエンシング、及びキーポイントによるハイスループット突然変異スクリーニングに使用したＤＮＡオリゴヌクレオチド。後者では、５’末端の最初の５塩基（太字）が、３Ｄマトリクスプーリングシステムにおける単一座標で特有のものである。タグは、最後の列に示されるように、これらの座標と結び付き、（１～１６）、（Ａ～Ｊ）及び（Ｉ～Ｘ）は、マトリクスの３軸それぞれの座標を示している。

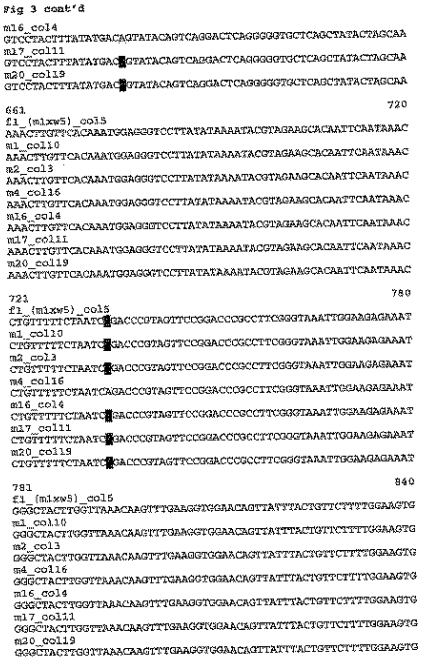
【図３－１】

【図３－２】

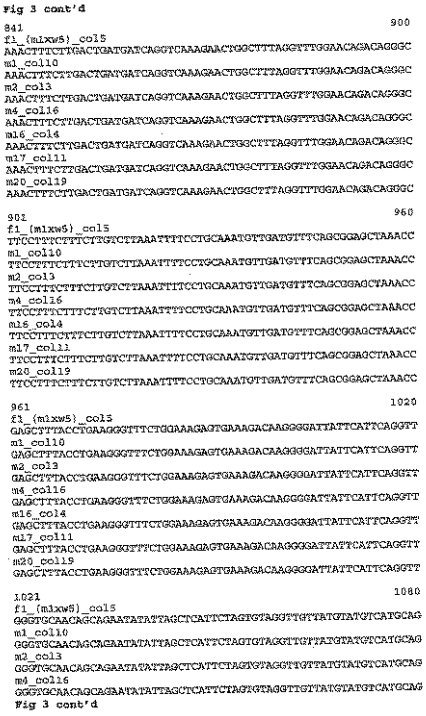
【図３－３】



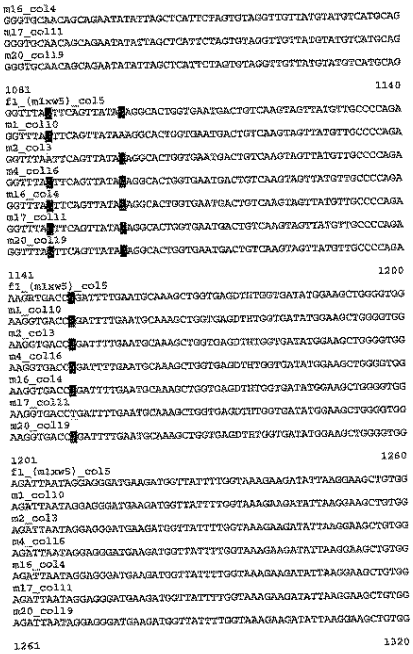
【図３－４】



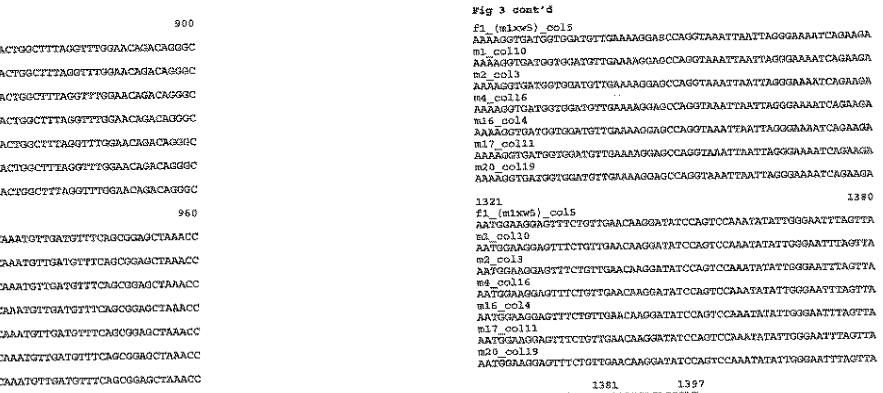
【図３－５】



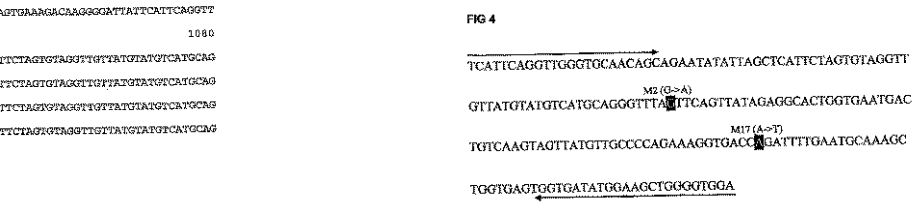
【図３－６】



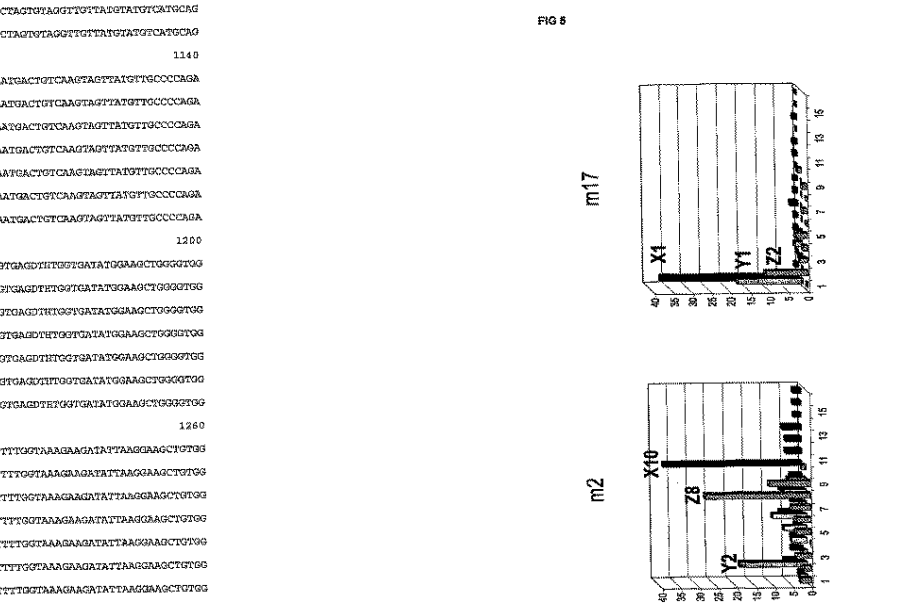
【図３－７】



【図４】



【図５】



【配列表】
0005791897000001.xml

フロントページの続き

(72)発明者　スツゥールマン，ユルーン
オランダ王国，エヌエル－６８６２　セーエヌ　オーステルベーク，ヤヘルスパト，２５

審査官　濱田　光浩

(56)参考文献　国際公開第２００７／０３７６７８（WO，Ａ１）
米国特許第６７３０８３２（ＵＳ，Ｂ１）
国際公開第９９／６５２９２（WO，Ａ１）
TILL BRADLEY J，GENOME RESEARCH，２００３年　３月　１日，V13 N3，P524-530
VANDENBUSSCHE MICHIEL，THE PLANT CELL，米国，２００３年１１月　１日，V15 N11，P2680-2693

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ０１Ｈ　　５／００
Ｃ１２Ｑ　　１／６８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）